



(13)

(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Gebrauchsmusterschrift**
(10) DE 200 05 738 U 1

(51) Int. Cl.⁷:
C 07 K 1/04
G 01 N 33/52

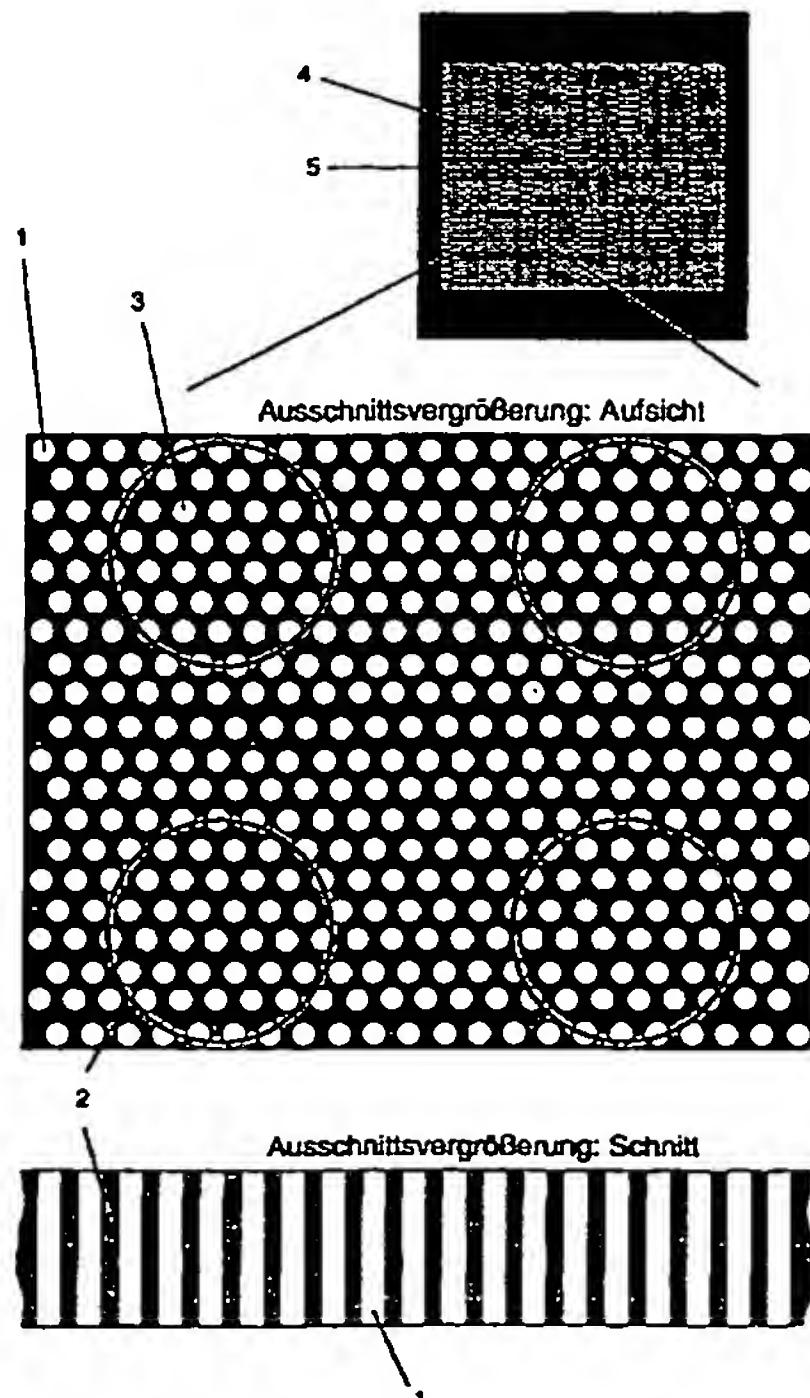
DE 200 05 738 U 1

(21) Aktenzeichen:	200 05 738.3
(22) Anmeldetag:	28. 3. 2000
(47) Eintragungstag:	17. 8. 2000
(43) Bekanntmachung im Patentblatt:	21. 9. 2000

(73) Inhaber:

Laser- und Medizin-Technologie gGmbH, Berlin,
12207 Berlin, DE

- (54) Vorrichtung zur Untersuchung der molekularen Wechselwirkungen von löslichen oder suspendierbaren Wirkstoffen mit festphasen-gebundenen peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen durch Kapillarplatten mit großer innerer Oberfläche
- (57) Vorrichtung zur Untersuchung der molekularen Wechselwirkung von löslichen oder suspendierbaren Wirkstoffen mit festphasen-gebundenen peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen dadurch gekennzeichnet, daß die dafür notwendige Oberfläche innerhalb einer Platte in Form von Kapillaren geschaffen wird. Die Kapillaren von einer Plattenseite zur gegenüberliegenden Seite durchgehen, dabei aber untereinander nicht verbunden sind.



DE 200 05 738 U 1

DE-OS-00

Vorrichtung zur Untersuchung der molekularen Wechselwirkungen von löslichen oder suspendierbaren Wirkstoffen mit festphasen-gebundenen peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen durch Kapillarplatten mit großer innerer Oberfläche

5 Stand der Technik

Im Gegensatz zu festphasen-immobilisierten miniaturisierten Nukleinsäurebibliotheken, über die eine Vielzahl von Publikationen in Fachzeitschriften und Patenten existieren (S.P.A. Fodor et al. (1991), *Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 251:767-773; E.M. Southern et al. (1992), Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. Genomics 13:1008-1017; G. McGall. et al. (1996), Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 26:13555-13560; M. Chee et al. (1996), Accessing genetic information with high density DNA arrays. Science 274:610-614; S. Singh-Gasson et al. (1999), Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. Nat. Biotechnol. 17:974-978; S.P.A. Fodor et al. (1995), Arrays of materials attached to a substrate. US 5744305; S.P.A. Fodor et al. (1995), Very large scale immobilized polymer synthesis. US 5424186; G.H. McGall et al. (1995), Spatially-addressable immobilization of oligonucleotides and other biological polymers on surfaces. US 5412087; A.S. Heuermann (1999), Method and device for photolithographic production of DNA, PNA and protein chips. WO 9960156A2; G.H. McGall und N.Q. Nam (2000), Synthesis of oligonucleotide arrays using photocleavable protecting groups. US 6022963) sind festphasen-immobilisierte stark miniaturisierte Peptid- oder Peptidomimetika-Bibliotheken bislang nur in wenigen Arbeiten beschrieben worden (S.P.A. Fodor et al. (1991), *Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 251:767-773; C.P. Holmes et al. (1995), The use of light-directed combinatorial peptide synthesis in epitope mapping. Biopolymers 37:199-211; M.C. Pirrung et al. (1992), Large scale photolithographic solid phase synthesis of polypeptides and receptor binding thereof. US 5143854; M.C. Pirrung et al. (1995), Large scale photolithographic solid phase synthesis of an array of polymers. US 5405783).**

Einer der Hauptgründe, warum miniaturisierte Peptidbibliotheken, sog. „Peptid-Chips“, bislang noch keine weite Verbreitung gefunden haben, ist der relativ große Aufwand bei

DE 20000738 U1

05.07.00

der Herstellung solcher Anordnungen, falls die üblichen, bei „DNA-Chips“ verwendeten, photolithographischen Syntheseverfahren auf planaren Trägern zum Einsatz kommen. Diese Verfahren machen sich im Falle der Nukleinsäuren die Tatsache zu Nutze, daß es nur 4 verschiedene natürlich vorkommende Nukleotide (Desoxyadenosin,
5 Desoxycytidin, Desoxyguanosin und Thymidin) für den Aufbau von Desoxyribonukleinsäureoligomeren gibt, daß die Kopplungszeiten beim Aufbau der Oligonukleotide relativ kurz (weniger als 30 min) und die Ausbeuten der einzelnen Kopplungsschritte sehr gut (mehr als 99%) sind. Alle drei Kriterien haben entscheidenden Einfluß auf die Herstellungsdauer für solche Chips und damit die
10 Wirtschaftlichkeit des gesamten Vorgangs.

Bei der photolithographischen Synthese von Oligonukleotiden wird zunächst ein mit einer photolabilen Schutzgruppe vollständig geschützter Träger an den Stellen, an denen z.B. ein Thymidinphosphat aufgebracht werden soll, ortsgerichtet durch Bestrahlung mit Licht entschützt und dann der ganze Träger mit am 5'-OH photolabil geschütztem
15 Thymidinphosphoamidit und geeigneten Kopplungsreagenzien inkubiert. Die Kopplung erfolgt so nur an den gewünschten Stellen und der ganze Prozess muss für die drei anderen Nukleotide wiederholt werden bevor das erste Dinukleotid synthetisiert werden kann. Bei einem Chip, der mit 20-mer Oligonukleotiden belegt wird, sind daher 80
Kopplungs-, Wasch- und Entschützungszyklen erforderlich.

20 Beim Peptid ist jedoch die Zahl der Komponenten, die zur Kopplung eingesetzt werden können, deutlich höher als im Falle der Nukleinsäuren. Es gibt 20 proteinogene Aminosäuren, einige natürlich vorkommende nicht-proteinogene Aminosäuren (z.B. Ornithin), die gleiche Zahl an entsprechenden D-Aminosäuren sowie eine kontinuierlich steigende Zahl von artifiziellen Aminosäuren, wie z.B. Cyclohexylalanin,
25 Aminoisobuttersäure, Norvalin, etc., ebenfalls jeweils in D- und L-Form. Zusammengenommen kann davon ausgegangen werden, daß zur Zeit etwa 100 verschiedene Aminosäuren zur chemischen Synthese von Peptiden und Peptidomimetika zur Verfügung stehen. Werden - konservativ betrachtet - nur die Hälfte dieser Reagenzien zur Synthese einer Substanzbibliothek eingesetzt, ergeben sich 1.000
30 Kopplungs- und Entschützungszyklen bei der Synthese einer 20-mer Peptid- bzw. Peptidomimetikabibliothek. Darüberhinaus liefert die Festphasenpeptidsynthese in der Regel Kopplungsausbeuten von 85-90% bei Reaktionszeiten von etwa 30 min, so daß üblicherweise mindestens eine Wiederholung des Kopplungsschritts mit frischen Reagenzien notwendig ist, um die erforderlichen Syntheseausbeuten zu erzielen. Dies

DE 2000 05 738 U1

bedeutet, daß extrem lange Synthesezeiten von Wochen bis hin zu mehreren Monaten für die Herstellung einer auf einem zweidimensionalen Träger immobilisierten Peptid- oder Peptidomimetikabibliothek einkalkuliert werden müssen, wenn nach photolithographischen Verfahren vorgegangen wird. Folglich wurden bislang nur photolithographische Synthesen von kurzen Peptiden geringer Sequenzvariabilität beschrieben (S.P.A. Fodor et al. (1991), *Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis*. *Science* 251:767-773; C.P. Holmes et al. (1995), *The use of light-directed combinatorial peptide synthesis in epitope mapping*. *Biopolymers* 37:199-211; M.C. Pirrung et al. (1992), *Large scale photolithographic solid phase synthesis of polypeptides and receptor binding thereof*. US 5143854).

Ein alternatives Verfahren, das die Zahl der Arbeitsschritte erheblich reduziert, beruht auf der gleichzeitigen Entschützung aller trägergebundenen Reaktionspartner gefolgt von der parallelen oder sequentiellen ortsgerichteten Applikation der unterschiedlichen Aminosäurereaktionsmischungen in definierte Probenareale. Damit können auch Bibliotheken aus längeren und komplexen Peptiden oder Peptidomimetika in einem akzeptablen Zeitrahmen synthetisiert werden. Hauptproblem hierbei ist allerdings die zu erwartende Kreuzkontamination der Reaktanden, wenn die Probenareale dicht beieinander liegen. Eine dichte Packung der Probenareale wiederum ist wünschenswert, um die Substanzbibliothek ausreichend zu miniaturisieren.

20

Eine mögliche Lösung des Problems besteht in der Erhöhung der Grenzflächenspannung in den Bereichen zwischen den Probenarealen des planaren Trägers, so daß die Reaktionsmischungen als kleine Tröpfchen im Bereich der Probenareale verharren. Um dieses Ziel zu erreichen, muß die Trägeroberfläche zwischen den Probenarealen fluoralkyliert werden, wie in T.M. Brennan (1995), *Method and apparatus for conducting an array of chemical reactions on a support surface*, US 5474796; T.M. Brennan (1997), *Method and apparatus for conducting an array of chemical reactions on a support surface*, EP 703825B1 und T.M. Brennan (1999), *Method and apparatus for conducting an array of chemical reactions on a support surface*, US 5985551 beschrieben. Das Verfahren besitzt allerdings den Nachteil, daß die Tropfen ohne schützende Ummantelung stark der Verdunstung ausgesetzt sind, was insbesondere bei sehr kleinen Probenvolumina ein erhebliches Problem darstellen kann.

Eine alternative Lösung des Kreuzkontaminationsproblems besteht in der Verwendung einer porösen Membran, die die Aminosäurereaktionsmischung am Ort der Applikation

05.07.200

sofort aufsaugt (R. Frank (1992), *Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support*. *Tetrahedron* 48:9217-9232; R. Frank und S. Güler (1992), *Verfahren zur schnellen Synthese von trägergebundenen oder freien Peptiden oder Oligonukleotiden, damit hergestelltes Flachmaterial, Verwendung sowie Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens*. WO 92/04366; J. Schneider-Mergener (1994), *Verfahren zur Synthese und Selektionierung von Sequenzen aus kovalent verbundenen Bausteinen*. WO 94/20521). Die ungeordneten Kapillaren in der porösen Membran führen bei zunehmender Miniaturisierung der Probenareale allerdings zu einer Kreuzkontamination und die relativ große Oberfläche der Membran führt auch bei diesem Verfahren zur Verdunstung des Lösungsmittels und damit u.U. auch zu einer Beeinträchtigung der Kopplungsreaktion. Ein weiteres Problem, das beim Einsatz der hier üblicherweise verwendeten Zellulosemembranen auftritt, ist eine zum Teil sehr starke Heterogenität des synthetisierten Produktes. Bei einer massenspektroskopischen Untersuchung des gesamten von einem Probenareal abgelösten Materials findet man sowohl aminoterminal als auch carboxyterminal verkürzte Peptide, die dadurch entstehen, daß aus sterischen Gründen innerhalb der Membran die Synthese zu früh abbricht und daß Kettenneustarts durch Veresterung von Aminosäuren direkt am Zellulosesubstrat auch in späteren Syntheszyklen noch stattfinden können. Es werden insbesondere um 1-4 Aminosäuren carboxyterminal verkürzte Peptide nachgewiesen (D. Goehmann und A. Frey, unveröffentlichte Resultate). Eine komplette Blockierung der Hydroxylgruppen der Zellulose durch Acetylierung oder ähnliche Maßnahmen zur Verhinderung von Kettenneustarts verbietet sich, da der Träger dadurch eine höhere Löslichkeit in den üblicherweise zur Festphasenpeptidsynthese verwendeten Lösungsmitteln gewinnt und erheblich an mechanischer Stabilität verliert (D. Goehmann und A. Frey, unveröffentlichte Resultate). Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von Membranen besteht in ihren optischen Eigenschaften. Insbesondere Zellulosemembranen weisen eine starke Eigenfluoreszenz im Emissionsbereich vieler handelsüblicher Fluorophore auf, so daß die Empfindlichkeit des Nachweises von Wirkstoffen, die an die Zielmoleküle binden, stark reduziert ist (J. Helfmann, unveröffentlichte Resultate).

Ein weiterer Ansatz zur Lösung des Kreuzkontaminationsproblems bei der Beschickung eines planaren Trägers mit einer Substanzbibliothek besteht in der Verwendung eines Mikroreaktorsystems, bei dem der planare Träger eine Gefäßwand für eine Vielzahl von

DE 20005738 U1

Reaktionskavitäten und zugleich das Trägermedium für die Zielmoleküle darstellt. Die so allseitig umschlossenen Reaktionskavitäten werden z.B. durch Umpositionieren des Mikroreaktorblocks oder mit Hilfe von Mikrokanälen, elektroosmotischen Pumpen und Mikroventilen im Reaktorblock gezielt mit den gewünschten Reagenzien und Waschlösungen versorgt. Abfallprodukte werden auf analoge Weise entfernt (J.L. Winkler et al. (1995), *Very large scale immobilized polymer synthesis using mechanically directed flow paths*. US 5384261; P.J. Zanzucchi et al. (1997), *Method of synthesis of plurality of compounds in parallel using a partitioned solid support*. US 5643738; P.J. Zanzucchi et al. (1998), *Partitioned microelectronic device array*. US 5755942; S.C. Cherukuri et al. (1999), *Method and system for inhibiting cross-contamination in fluids of combinatorial chemistry device*. US 5980704). Ein entscheidender Nachteil solcher Anordnungen ist jedoch ihre Anfälligkeit gegen partikuläre Verunreinigungen in den Reaktionslösungen, insbesondere wenn die Kanäle nur wenige Mikrometer Durchmesser aufweisen und die Flußrichtung der Reagenzien und Abfallprodukte im Mikroreaktorblock mehrfach geändert wird. Die Gefahr einer Verstopfung des Mikroreaktorsystems ist insbesondere bei Kopplungsreaktionen mit Carbodiimiden sehr groß, da die hierbei entstehenden organischen Harnstoffderivate eine starke Tendenz zur Kristallisation aufweisen. Im ungünstigsten Fall muß dann der komplette Mikroreaktorblock ersetzt werden.

20

Die existierenden bzw. in der Literatur oder Patenten beschrieben Verfahren weisen alle erhebliche Nachteile auf. Es wird entweder keine große Oberfläche und damit keine hohe Nachweisempfindlichkeit bei kleinen äußeren Abmessungen geboten oder die Synthesezeiten sind insgesamt zu lang. Der optische Nachweis wird durch Eigenfluoreszenz stark gestört und Kettenabbrüche führen zu einer inhomogenen Probe. Bei dichter Packung der Substanzbibliothek ist eine Kreuzkontamination zwischen verschiedenen Probenarealen zu beobachten. Bei kleinen Volumina beeinflußt die Verdunstung die Ergebnisse. Die Handhabung ist umständlich oder sehr empfindlich gegen Partikel.

25

05.07.00

Erfindungsgemäße Lösung

- Die Nachweisempfindlichkeit für die Wechselwirkung (z.B. Bindung) von Wirkstoffen in der Flüssigphase mit festphasen-gebundenen Zielmolekülen wird wesentlich bestimmt durch die Anzahl der festphasen-gebundenen Zielmoleküle. Bei einem ideal planaren Träger ist die zur Bindung zur Verfügung stehende feste Phase auf die äußere Oberfläche des Trägers begrenzt. Ein optisches Nachweissystem (z.B. Fluoreszenzdetektion) ist jedoch immer in der Lage, zusätzlich ein bestimmtes Volumen ober- und unterhalb der äußeren Oberfläche zu erfassen.
- 10 Die Erfindung betrifft eine Struktur, die aus Glas, Quarz, Keramik, Kunststoff, Halbmetall oder Metall bestehen kann und durch eine hohe Dichte kleiner Kapillaren [1] (Durchmesser 5-100 µm) eine große innere Oberfläche mit einem Mehrfachen der äußeren Oberfläche besitzt (siehe Figur 1). Die gesamte Dicke dieser Kapillarplatte [4] (Dicke bis zu 10 mm) und damit die gesamte Länge der Kapillaren [1] und deren 15 Oberfläche wird durch eine Nachweisapparatur erfaßt. Da die maximale Belegung (Anzahl von Molekülen) der Kapillarplatte [4] durch die Größe der inneren Oberfläche bestimmt ist, und diese im Vergleich zur äußeren Oberfläche um ein Vielfaches (100- bis 1000-fach) größer ist, erhöht sich im gleichen Maße die Nachweisempfindlichkeit bei Nutzung der Kapillarplatte [4] gegenüber einer planaren Probenanordnung.
- 20 Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß auf einer silanisierten Oberfläche in hoher Qualität peptidische und peptoide Moleküle synthetisiert werden können und die Zahl der Kettenneustarts fast vollständig eliminiert werden kann. Wenn zusätzlich noch ein verlängertes Ankermolekül, das als Abstandshalter dient, zwischen die Oberfläche und das Zielmolekül gekoppelt wird, werden die Kettenabbrüche stark reduziert und die 25 Zugänglichkeit für die Wirkstoffe erheblich verbessert.

Zur Herstellung einer Bibliothek von Zielmolekülen, von der jede einzelne Spezies oder definierte Mischungen bestimmter Spezies an vorher definierte Bereiche der Kapillarplatte [4] synthetisiert oder gebunden werden, muß zunächst die innere Oberfläche der Kapillarplatte [4] zur kovalenten Bindung der Zielmoleküle befähigt 30 werden. Dies geschieht durch Aufbringen einer Organosilanschicht, die funktionelle Gruppen zur Verankerung von peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen aufweist. Vorzugsweise wird dazu ein γ-Aminopropyltrialkoxysilan verwendet, es sind aber auch andere organofunktionelle Silane, wie z.B. γ-Mercaptopropyltrialkoxysilan, für diesen Zweck geeignet. Bei Verwendung von Metall- oder Halbmetallkapillarplatten muß

DE 200 05 738 UU

05.07.00

zuvor eine Oxidschicht zur Bindung des Silans mittels Oberflächenoxidation der Kapillarplatte geschaffen werden.

Auf dieser organofunktionalisierten Kapillarplatte [4] wird dann durch ortsabhängiges Aufbringen (z.B. durch Pipettieren) einer Substanz jeweils ein Probenareal [3] angelegt.

- 5 Bei der Substanz kann es sich im einfachsten Falle um ein Reagenz handeln, das die zur Bindung vorgesehenen funktionellen Gruppen der Organosilanschicht temporär schützt. In einer vorzugsweisen Ausführungsform wird allerdings ein Ankermolekül in den Probenarealen [3] aufgebracht, mit dem die Zielmoleküle zwischen 0,5 bis 20 nm über die innere Oberfläche der Kapillarplatte [4] hinausgehoben werden können, um so eine
10 bessere Wirkstoffbindung zu ermöglichen. Als Ankerreagenz wird z.B. Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützter α -Amino-poly(ethylenglycol)- ω -propionsäure-N-hydroxybenzotriazolester verwendet.

Anschließend werden alle nicht mit Schutz- oder Ankerreagentien derivatisierten Bereiche der Kapillarplatte [4] chemisch so abgesättigt, daß dort zu einem späteren
15 Zeitpunkt weder eine Synthese oder Kopplung von Zielmolekülen noch eine unspezifische Bindung von Wirkstoffen erfolgen kann.

Durch Kenntnis der Substanz, die an jedem Ort gebunden bzw. synthetisiert wird, ist eine parallele Analyse der Wechselwirkungen von verschiedenen Zielmolekülen mit applizierten Wirkstoffen möglich. Voraussetzung dafür ist, daß keine wechselseitige
20 Verunreinigung beim ortsabhängigen Aufbringen oder Synthetisieren der Zielmoleküle geschieht.

In Weiterführung des Erfindungsgedankens wird dies durch die parallele Anordnung der senkrecht zur Plattenoberfläche verlaufenden Kapillaren [1], die nur zu den äußeren Plattenoberflächen hin offen sind, erreicht. Durch das somit erzielte Fehlen jeglicher
25 Querverbindungen zwischen verschiedenen Probenarealen [3] werden Kreuzkontaminationen auch bei großer Dichte der Probenareale [3] erfolgreich verhindert. Ein Probenareal [3] umfaßt mehrere (z.B. bis zu 4.000) Kapillaren [1]. Aufpipettierten Substanzen werden in die Kapillaren [1] gezogen, was je nach Flüssigkeit auch durch Erzeugen eines Unterdrucks auf einer Kapillarplattenseite
30 unterstützt wird. Ein Fließen aus den Kapillaren [1] heraus über mehrere Kapillaren [1] hinweg in ein anderes Probenareal [3] ist ausgeschlossen, da die Flüssigkeit durch Kapillarkraft in der Kapillare gehalten wird. Ein Heraustropfen von Lösungen aus den Kapillaren [1] aufgrund sehr geringer Viskosität wird bei diesen Flüssigkeiten durch

DE 200 05 738 U1

05.07.00

eine dicht an die Unterseite der Kapillarplatte [4] positionierte Platte [12] (Figur 2) mit hydro- und oleophober Oberfläche wirksam unterdrückt.

In Fortsetzung des Erfindungsgedankens ist aufgrund der nach beiden äußereren Plattenoberflächen hin offenen Kapillaren [1] auch eine einfache Automatisierung einer 5 in der Kapillarplatte [4] durchgeführten Festphasenpeptidsynthese möglich. Eine Apparatur zur synchronen Applikation von Wasch- und Reagenzlösungen auf alle Bereiche der Kapillarplatte [4] ist in Figur 2 dargestellt.

Die Inkubation der Substanzbibliothek mit Wirkstofflösungen oder -suspensionen sowie Spülvorgänge davor und danach werden in einer bevorzugten Ausführungsform mit 10 einem einfachen Aufbau durchgeführt, wie er in Figur 3 dargestellt ist.

Die Analyse der Wirkstoffbindung geschieht in einem bevorzugten Ausführungsbeispiel optisch anhand von Fluoreszenzmarkierungen durch Bindung eines Fluorophors an die Wirkstoffe. In einer alternativen Ausführungsform sind die Fluorophore an die Zielmoleküle gebunden. In Figur 4 ist eine Nachweisapparatur zum Auslesen der 15 Fluoreszenz gezeigt. Zum Auslesen wird das einzelne Probenvolumen, das sich aus der Dicke der Kapillarplatte und dem Probenbereich [3] zusammensetzt, sowohl von Anregungslight vollständig durchsetzt als auch von der Detektionsoptik vollständig erfaßt. Die Vielzahl der Probenorte wird durch zeitlich sequentielles Abrastern erfasst, wobei entweder die Kapillarplatte zweidimensional unter der ortsfesten optischen 20 Anordnung bewegt wird oder der Strahlengang über die Kapillarplatte bewegt wird. Die Verwendung von Quarz oder Glas als Material für die Kapillarplatte minimiert hier erfindungsgemäß den Einfluß der störenden Fremdfluoreszenz.

Detaillierte Beschreibung der erfindungsgemäßen Lösung in einer bevorzugten 25 Ausführungsform

Es wird beschrieben wie die gesamte Kapillarplatte hergestellt wird. Anschließend werden die Probenareale erzeugt und darauf die Substanzen synthetisiert. Für alle Vorgänge, der die Kapillarplatte vollständig ausgesetzt wird, wie z.B. Waschen, ist eine 30 automatisierte Vorrichtung beschrieben. Diese Vorrichtung ist mit einem Pipettierroboter kombiniert, so daß die Kapillarplatte in der gleichen Vorrichtung gewaschen und entschützt werden kann sowie die einzelnen Syntheseschritte durchgeführt werden können. Zur Untersuchung der Bindung eines Wirkstoffs an die Substanzbibliothek wird eine weitere Vorrichtung beschrieben, in die die Kapillarplatte

DE 200 05 738 U1

eingelegt wird und mit dem Wirkstoff in Kontakt gebracht wird. Hierin wird gleichzeitig der optische Nachweis der Bindung durchgeführt.

Derivatisierung der Kapillarplatte zur Aufnahme der Substanzbibliothek

- 5 Die Kapillarplatte wird durch Ätzen aus homogenem Glas, in einem alternativen Verfahren aus heterogenem Glas, hergestellt. Das Oxidieren von Silizium- und Metalloberflächen und Silanisieren von Glas-, Quarz-, Silizium-, Keramik- sowie oxidierten Silizium- oder Metalloberflächen ist Stand der Technik und wurde in der Fach- und Patentliteratur bereits vielfach beschrieben (z.B. zur Oberflächenoxidation eines Siliziumträgers: A.W. Flounders et al. (1997), *Patterning of immobilized antibody layers via photolithography and oxygen plasma exposure. Biosensors Bioelectronics* 12:447-456; z.B. zur Silanisierung: M. Lynn (1975), *Inorganic support intermediates: covalent coupling of enzymes on inorganic supports. In: „Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides“*, H.H. Weetall, Hrsg., Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 1-48; H.M. Weetall (1976), *Covalent coupling methods for inorganic support materials. Methods Enzymol.* 44:134-148).
- 10 In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird dazu eine unbehandelte Kapillarplatte [4] mit Oberflächenoxid-, Keramik- oder Glasbeschichtung entweder in einer oxidierenden Säure, wie z.B. Chromschwefelsäure oder heißer konzentrierter Salpetersäure, für eine
- 15 Stunde von adsorbierten organischen Verbindungen befreit, fünf- bis zehnmal durch Durchsaugen von hochreinem Wasser (auf einer Nutsche, Glasfritte oder einer speziell für die Kapillarplatte [4] entwickelten Spülvorrichtung (Figur 2) gewaschen und bei 250 °C getrocknet.

25

Vorrichtung zum vollautomatischen Waschen, Absättigen und Entschützen

Das vollautomatische Waschen, Absättigen und Entschützen ist die bevorzugte Ausführungsform bei der Herstellung der Substanzbibliothek (Figur 2).

- 30 Zur Montage wird die Kapillarplatte [4] auf das Unterteil eines Synthesetisches [6] gelegt, der fest mit einem Pipettierroboter verbunden ist. Dabei kommen die Randbereiche [5] der Kapillarplatte auf einer weichen, lösungsmittelresistenten Dichtung [7] zu liegen. Anschließend werden Abstandhalter [8] rings um die

Kapillarplatte [4] dicht an die Randbereiche [5] herangeschoben und durch Gewindegelenken [9] gegen Verschieben gesichert, so daß die Kapillarplatte [4] auf dem Probentisch ortsfest positioniert ist. Danach wird das Oberteil des Synthesetisches [10] auf die Gewindegelenken [9] gesteckt und mit Hilfe einer Mutter [11] gegen die
5 Kapillarplatte [4] und den Abstandhalter [8] bzw. das Unterteil des Synthesetisches [6] gezogen, so daß die im Ober- und Unterteil des Synthesetisches [10 und 6] befindlichen Dichtungen [7] zusammengepreßt werden und die Kapillarplatte [4] zur Seite hin abdichten.

Für das Beschicken der Probenareale [3] wird der hydrophob und oleophob beschichtete
10 Kolben [12] an die Unterseite der Kapillarplatte [4] herangeschoben, so daß keine Reaktionslösung während der Kopplungsreaktion nach unten aus der Kapillarplatte [4] austreten kann.

Zum Waschen nach Beendigung der Kopplungsreaktion wird die gesamte Kapillarplatte
15 [4] aus den Waschlösungszuflüssen [13] mit Waschlösung überschichtet, der Kolben [12] nach unten bewegt und zur Entfernung der durch die Kapillarplatte [4] gesaugten Lösungen am Ablauf [14] Vakuum angelegt. Dann wird der Kolben [12] wieder an die Unterseite der Kapillarplatte [4] herangeschoben, die Kapillarplatte [4] wieder mit Waschlösung überschichtet und der Waschvorgang beliebig wiederholt (Figur 2A). Nach Abschluß des Waschvorgangs wird so lange Luft durch die Kapillarplatte [4]
20 gesaugt, bis alle Lösungsmittelreste verdunstet sind. Dann wird der Kolben wieder an die Kapillarplatte [4] herangeschoben und ein erneuter Pipettierzyklus durchgeführt, die Platte abgesättigt oder entschützt.

Zum Absättigen nicht reagierter Aminofunktionen und zum Entschützen von
25 Aminofunktionen wird der Kolben [12] nach unten geschoben und die Kavität, die durch Zurückziehen des Kolbens [12] unterhalb der Kapillarplatte [4] entsteht, mit der gewünschten Reaktionslösung durch den Reagenzienzufluß [15] befüllt. Bei verschlossenem Ablauf [14] und Reagenzienzufluß [15] wird der Kolben für die Dauer der Reaktion langsam auf- und abbewegt, so daß die Reaktionslösung in gleichmäßigem Fluß durch die Kapillaren [1] strömt und die Reaktion stattfinden kann (Figur 2B).
30 Anschließend wird die Kapillarplatte [4] wie oben beschrieben gewaschen.

Vorrichtung zur Bindung von Wirkstoffen an die auf der Kapillarplatte immobilisierte Substanzbibliothek

Zur Untersuchung der Bindung von Wirkstoffen an die auf der inneren Oberfläche der Kapillarplatte [4] befindliche Substanzbibliothek ist eine Vorrichtung notwendig, mit der eine Wirkstofflösung oder -suspension gleichmäßig durch alle Kapillaren [1] gespült werden kann, so daß jede Wirkstoffkomponente mit jeder Zielmolekülspezies in 5 Kontakt kommen kann (Figur 3).

Im bevorzugten Ausführungsbeispiel wird zur Montage die Kapillarplatte [4] auf das Unterteil des Inkubationstisches [16] gelegt. Dabei kommen die Randbereiche [5] der Kapillarplatte auf einer weichen Dichtung [17] zu liegen. Anschließend werden Abstandhalter [18] rings um die Kapillarplatte [4] gelegt, das Oberteil des 10 Inkubationstisches [19] aufgesetzt und durch eine Klammer [20] mittels Andruckfedern [21] auf die Kapillarplatte [4] und den Abstandhalter [18] bzw. das Unterteil des Inkubationstisches [16] gedrückt, so daß die im Ober- und Unterteil des 15 Inkubationstisches [19 und 16] befindlichen Dichtungen [17] zusammengepreßt werden und die Kapillarplatte [4] zur Seite hin abdichten. Dann wird ein Ultraschallgeber [22] in eine Ausparung des Abstandhalters [18] geschoben, bis er Kontakt mit dem Randbereich [5] der Kapillarplatte [4] hat.

Zur Beschickung der Vorrichtung wird der Kolben [23] nach unten geschoben und die Kavität, die durch Zurückziehen des Kolbens [23] unterhalb der Kapillarplatte [4] entsteht, mit der gewünschten Wirkstofflösung oder -suspension durch den 20 Einfüllstutzen [24] befüllt. Das Volumen der Wirkstofflösung oder -suspension sollte mindestens das 1,5-fache des inneren Volumens der Kapillarplatte [4] plus das Volumen der über der Kapillarplatte [4] befindlichen Kavität [25] betragen.

Zur Inkubation wird bei verschlossenem Ablauf [26] und Einfüllstutzen [24] der Kolben [23] langsam nach oben bewegt, so daß die Luft aus den Kapillaren [1] in die Kavität 25 [25] entweichen kann. Noch in Kapillaren [1] eingeschlossene Luft kann durch Beschallung mit dem Ultraschallgeber [22] entfernt werden. Wenn der Kolben [23] bis an die Kapillarplatte [4] herangeschoben wird, füllt sich die Kavität [25] vollständig mit Wirkstofflösung oder -suspension und sowohl die Luft als auch überzählige 30 Wirkstofflösung bzw. -suspension weichen durch seitliche Kanäle [27] in die Ausgleichsgefäß [28] aus. Durch wiederholtes Heben und Senken des Kolbens [23] mit kurzem Hub wird dann die Lösung oder Suspension in den Kapillaren [1] mit der in der Kavität [25] befindlichen Lösung oder Suspension gemischt und noch in der Kavität [25] befindliche Luftblasen schrittweise in die Ausgleichsgefäß [28] vertrieben.

Zum Entleeren der Vorrichtung wird der Kolben [23] so weit zurückgeschoben, daß der Ablauf [26] freikommt, durch den dann die Wirkstofflösung oder -suspension durch Anlegen von Unterdruck entfernt wird.

Das Waschen der Vorrichtung erfolgt in analoger Weise unter Verwendung geeigneter
5 Waschlösungen.

Die ortsaufgelöste Detektion der Wirkstoffreaktion mit den Zielmolekülen kann ebenfalls in der Vorrichtung erfolgen, da die über der Kapillarplatte [4] befindliche Kavität [25] nach oben durch ein transparentes Fenster [29] begrenzt wird und damit beispielsweise die Bindung oder die Abspaltung von Fluorophoren in der Vorrichtung
10 mit Hilfe der in Figur 4 beschriebenen Meßeinrichtung detektiert bzw. verfolgt werden kann.

Vorrichtung zum Nachweis der Bindung von Wirkstoffen an Zielmoleküle

Für den Nachweis von Bindungen in der Kapillarplatte werden optische Methoden die eine Durchdringung der Stege zwischen den Kapillaren erlauben, verwendet. Die vielfältigsten optischen Methoden basieren auf Fluoreszenzmarkierungen (z.B. M.V. Rogers (1997), *Light on high-throughput screening: fluorescence-based assay technologies, Drug discovery Today 2:156-160*). Die Fluoreszenzmarkierung wird durch Kopplung eines Fluorophors entweder an die Zielmoleküle oder an die Wirkstoffe hergestellt. Zum Auslesen wird im bevorzugten Ausführungsbeispiel das einzelne Probenvolumen, das dem Probenareal [3] über die gesamte Dicke der Kapillarplatte entspricht, sowohl von Anregungslicht vollständig durchsetzt, als auch von der Detektionsoptik vollständig erfaßt. Um ein Übersprechen von benachbarten Probenarealen zu verhindern, wird zu einem Zeitpunkt nur ein Probenort beleuchtet und
20 die Detektion nur auf einen Probenort begrenzt. Die Vielzahl der Probenorte wird durch zeitlich sequentielles Abrastern erfasst. Die Messung an einem Probenort kann sowohl kontinuierlich als auch mit repetierenden Pulsen geschehen. Im ersten Fall wird mit einer kontinuierlich abstrahlenden bandpaßgefilterten Lichtquelle oder einem Laser bestrahlt, wobei das schmalbandige Anregungslicht an die Absorption des
25 Fluoreszenzmarkers angepaßt ist. Die Detektion geschieht schmalbandig im Bereich der Fluoreszenzemission des Fluoreszenzmarkers mit einem geeigneten Photodetektor. Bei der in Figur 4 dargestellten gepulsten Fluoreszenzanregung wird ein Laser [30] zur Beleuchtung eingesetzt, dessen Pulsdauer mindestens ein Drittel der Lebensdauer des Markierungs-Fluorophors beträgt. Der kollimierte Strahl des Lasers [31] wird durch
30

einen wellenlängenselektiven Strahlteiler [32] in Richtung auf die Kapillarplatte [4] reflektiert. Durch ein Objektiv [33] wird der Strahl so auf ein Probenareal [3] der Kapillarplatte [4] fokussiert, daß das gesamte Probenvolumen eines Probenareals [3] durchstrahlt wird. Das isotrop abgestrahlte Fluoreszenzlicht [34] der 5 Fluroreszenzmarkierung wird durch das gleiche Objektiv [33] kollimiert und passiert den selektiven Strahlteiler [32] aufgrund der größeren Wellenlänge der Fluoreszenz. Durch ein schmalbandiges Filter [35] wird Streulicht des Anregungslasers stark unterdrückt, das Fluoreszenzlicht bei möglichst hoher Transmission aber durchgelassen. Mit einem weiteren Objektiv [36] wird das Fluoreszenzlicht auf den Photodetektor [37] 10 fokussiert. Durch eine zeitaufgelöste Detektion mit einer Anstiegszeit von kleiner als einem Drittel der Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors kann das Fluoreszenzsignal besonders vorteilhaft in einer Zeittor-Integrationstechnik mit einem Boxcar-Integrator [38] nach Abklingen sowohl des elastischen Streulichts, als auch von Raman-gestreutem Licht erfaßt werden. Das Zeittor wird sinngemäß ca. nach der zweifachen 15 Laserpulsdauer geöffnet und bleibt für ca. die zweifache Fluorophorlebensdauer offen. Ein Triggersignal vom Laser [39] liefert die Zeitbasis für das Zeittor. Mit Hilfe eines der Laserpulsenergie proportionalen Signals vom Laser [40] kann über einen zweiten Kanal des Boxcar-Integrators [38] eine Normierung des Fluoreszenzlichts und damit eine Korrektur für Schwankungen der Laserpulsenergie durchgeführt werden. In einem 20 Rechner [41] werden alle Daten gesammelt und es kann abschließend eine Auftragung der Fluoreszenzintensität über dem jeweiligen Probenort dargestellt werden und eine Zuordnung der detektierten Signale zu den Zielmolekülen erfolgen.

Beschreibung der Figuren

25

Figur 1 enthält eine schematische Darstellung einer Kapillarplatte [4] in Aufsicht und als Schnitt. Die einzelnen Kapillaren [1] sind durch Stegbereiche [2] voneinander getrennt. Die Probenareale [3] umfassen eine Vielzahl von Kapillaröffnungen. Der Randbereich der Platte [5] enthält keine Kapillaren.

30

Figur 2 zeigt eine Vorrichtung zum vollautomatischen Waschen, Absättigen und Entschützen der Kapillarplatte [4] während der Synthese der Substanzbibliothek. Dabei ist die Kapillarplatte [4] zwischen Oberteil [10] und Unterteil [6] des Synthesetisches eingesetzt und mit Hilfe entsprechender Dichtungen [7] und Abstandhalter [8] über

einen Gewindegelenk [9] mit Mutter [11] in ihrer Position fixiert. Im Oberteil des Synthesetisches [10] befinden sich Waschlösungszuflüsse [13], im Unterteil [6] Reagenzienzufluß [15] und Ablauf [14]. Ein Kolben [12] kann im Unterteil des Synthesetisches [6] bewegt und bis an die Unterseite der Kapillarplatte [4] geschoben werden.

Figur 3 zeigt eine Vorrichtung zur Bindung von Wirkstoffen an die auf der Kapillarplatte immobilisierte Substanzbibliothek. Die Kapillarplatte [4] ist zwischen Oberteil [19] und Unterteil [16] des Inkubationstisches eingesetzt und mit Hilfe entsprechender Dichtungen [17] und Abstandhalter [18] durch eine Klammer [20] mit Andruckfeder [21] in ihrer Position fixiert. Ein Ultraschallgeber [22] ist seitlich an der Kapillarplatte [4] angebracht. Im Unterteil des Inkubationstisches befinden sich Einfüllstutzen [24] und Ablauf [26] für die Wirkstofflösungen, die mit einem Kolben [23] durch die Kapillarplatte [4] in die obere Kavität [25] gedrückt werden können. Seitliche Kanäle [27] führen aus der Kavität [25] in ein Ausgleichsgefäß, das zum Auffangen verdrängter Luft und überschüssiger Wirkstofflösung dient. Die Kavität [25] ist oben mit einem transparenten Fenster [29] abgeschlossen, so daß eine direkte optische Detektion von Reaktionen in der Vorrichtung möglich ist.

Figur 4 enthält eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zum Nachweis der Bindung von Wirkstoffen an die Substanzbibliothek mittels optischer Verfahren. Fluorophormarkierte Zielmoleküle auf der Kapillarplatte [4] werden durch einen von einem gepulsten Dioidenlaser [30] erzeugten Laserstrahl [31], der durch einen wellenlängenselektiven Strahlteiler [32] und ein Objektiv [33] auf das Probenareal gelenkt wird, zur Fluoreszenz angeregt. Das abgestrahlte Fluoreszenzlicht [34] durchdringt den Strahlteiler [32], einen Bandpaßfilter [35] und ein weiteres Objektiv [36], bevor es auf den Photodetektor [37] auftrifft. Für die Integration des Fluoreszenzsignals innerhalb eines Zeitintervalls erhält ein Boxcar-Integrator [38] vom Laser ein zeitliches Triggersignal [39] und zur Normierung des Fluoreszenzsignals ein der Laserenergie proportionales Signal [40]. Von einem Rechner [41] wird ein beweglicher Probentisch [42] so angesteuert, daß nacheinander die Probenareale gemessen werden können. Das normierte Fluoreszenzsignal wird über dem Probenort dargestellt.

05-07-00

Legende

- 1 Kapillare
- 2 Stegbereich zwischen Kapillaren
- 3 Probenareal
- 5 4 Kapillarplatte
- 5 Randbereich der Kapillarplatte
- 6 Unterteil des Synthesetisches
- 7 Lösungsmittelresistente Dichtung
- 8 Abstandhalter
- 10 9 Gewindegelenk
- 10 Oberteil des Synthesetisches
- 11 Mutter
- 12 Kolben
- 13 Waschlösungszufluß
- 15 14 Ablauf
- 15 Reagenzienzufluß
- 16 Unterteil des Inkubationstisches
- 17 Dichtung
- 18 Abstandhalter
- 20 19 Oberteil des Inkubationstisches
- 20 Klammer
- 21 Andruckfeder
- 22 Ultraschallgeber
- 23 Kolben
- 25 24 Einfüllstutzen
- 25 Kavität
- 26 Ablauf
- 27 Kanal
- 28 Ausgleichsgefäß
- 30 29 Transparentes Fenster
- 30 Gepulster Diodenlaser
- 31 Laserstrahl
- 32 Strahlteiler
- 33 Objektiv

DE 2000 05 736 U1

05-07-00

- 34 Abgestrahltes Fluoreszenzlicht
- 35 Bandpaßfilter
- 36 Objektiv
- 37 Photodetektor
- 5 38 Boxcar-Integrator
- 39 Triggersignal vom Laser
- 40 Der Laserpulsenergie proportionales Signal vom Laser
- 41 Rechner
- 42 Beweglicher Probentisch

10

DE 200 05 738 U1

~~Patentansprüche~~

1. Vorrichtung zur Untersuchung der molekularen Wechselwirkung von löslichen oder suspendierbaren Wirkstoffen mit festphasen-gebundenen peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen dadurch gekennzeichnet, daß die dafür notwendige Oberfläche innerhalb einer Platte in Form von Kapillaren geschaffen wird. Die Kapillaren von einer Plattenseite zur gegenüberliegenden Seite durchgehen, dabei aber untereinander nicht verbunden sind.
2. Vorrichtung nach 1 dadurch gekennzeichnet, daß eine Vielzahl von parallelen Kapillaren in der Platte angeordnet sind, die Flüssigkeiten durch Kapillarkraft in die Kapillaren ziehen und darin halten.
3. Vorrichtung nach 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Kapillarplatte aus einem der Materialien Glas, Quarz, Silizium, Kunststoff, Halbmetall, Keramik, Metall oder einer Kombination dieser Materialien hergestellt ist.
4. Vorrichtung nach 1 dadurch gekennzeichnet, daß die innere Oberfläche zur kovalenten Bindung von Zielmolekülen befähigt wird oder eine Synthese der Zielmolekülen erfolgt.
5. Vorrichtung nach 4 dadurch gekennzeichnet, daß die innere Oberfläche durch eine Organosilanschicht, die funktionelle Gruppen zur Verankerung von peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen aufweist, bedeckt ist.
6. Vorrichtung nach 4 dadurch gekennzeichnet, daß zur Silanisierung γ -Aminopropyltrialkoxysilan oder andere organofunktionelle Silane verwendet werden.
7. Vorrichtung nach 4 dadurch gekennzeichnet, daß bei Verwendung von Metall- oder Halbmetallkapillarplatten vor der Silanisierung eine Oxidschicht zur Bindung des Silans mittels Oberflächenoxidation der Kapillarplatte geschaffen wird.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche aus 4 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß in der Kapillarplatte örtlich begrenzte Probenareale angelegt werden.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche aus 4 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß eine Vielzahl von Probenarealen jeweils mit einem Durchmesser von bis zu 2.000 μm oder einer Anzahl von bis zu 4.000 benachbarten Kapillaren auf einer Kapillarplatte angelegt werden.
10. Vorrichtung nach 8 oder 9 dadurch gekennzeichnet, daß die Kapillaren eine Länge sowie die Kapillarplatte eine Dicke von 100 bis 2.000 μm besitzen.

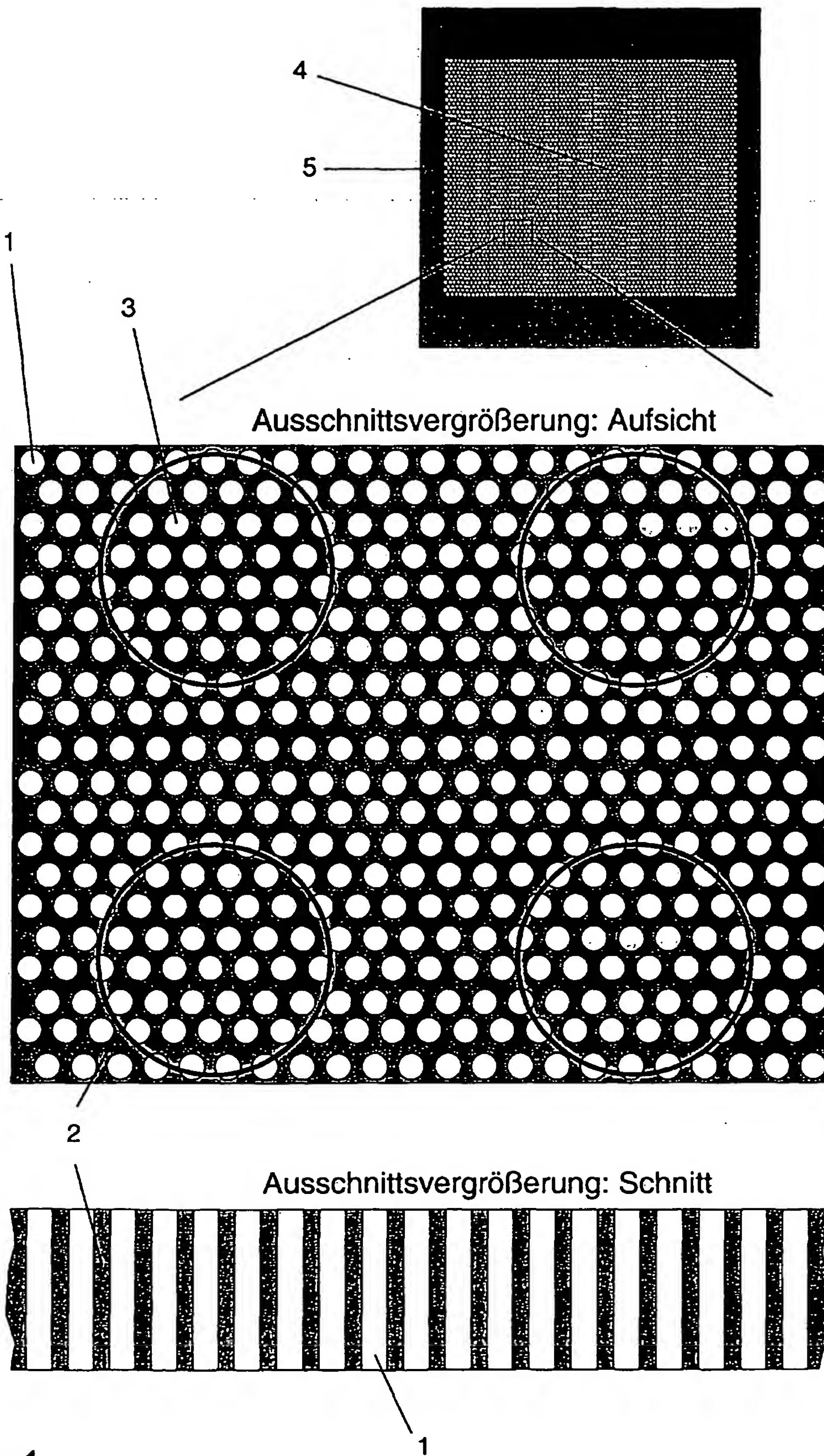
11. Vorrichtung nach einem der vorigen Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß durch Aufpipettieren einer Substanz auf die Kapillarplatte die funktionelle Gruppe der Organosilanschicht temporär geschützt wird. Der so geschützte Bereich stellt ein Probenareal dar.
- 5 12. Vorrichtung nach einem der vorigen Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß durch Aufpipettieren eines Reagens auf die Kapillarplatte ein geschütztes Ankermolekül an jeder Bindungsstelle des Probenareals entsteht, wobei das Ankermolekül gleichzeitig als Abstandshalter zur inneren Oberfläche dient.
13. Vorrichtung nach einem der vorigen Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß durch Aufpipettieren von Fluorenylmethoxycarbonyl (FMOc)-geschützter α-Amino-
10 poly(ethylenglycol)-ω-propionsäure-N-hydroxybenzotriazolester ein geschütztes Probenareal angelegt wird.
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche aus 11 bis 13 dadurch gekennzeichnet, daß alle nicht geschützten Bereiche der Kapillarplatte chemisch abgesättigt werden.
- 15 15. Vorrichtung nach 14 dadurch gekennzeichnet, daß die Schutzgruppen in den Probenarealen der gesamten Kapillarplatte entfernt werden.
16. Vorrichtung nach 15 dadurch gekennzeichnet, daß peptide oder peptoide Zielmoleküle ortsabhängig sequentiell aus Aminosäuren in den Probenarealen der Kapillarplatte synthetisiert werden.
- 20 17. Vorrichtung nach 15 dadurch gekennzeichnet, daß die vollständigen peptiden oder peptoiden Zielmoleküle ortsabhängig in den Probenarealen der Kapillarplatte gebunden werden.
18. Vorrichtung nach 16 oder 17 dadurch gekennzeichnet, daß durch die ortsabhängig unterschiedlichen Sequenzen von peptiden oder peptoiden
25 Zielmolekülen eine Substanzbibliothek aufgebaut wird.
19. Vorrichtung nach 18 dadurch gekennzeichnet, daß auf mindestens einer Seite der Kapillarplatte ein mit einem Ventil versehenes geschlossenes und variables Volumen existiert, in das Flüssigkeiten mit löslichen oder suspendierbaren Wirkstoffen sowie andere Flüssigkeiten und Gase eingelassen werden können und
30 abgesaugt werden können.
20. Vorrichtung nach 18 dadurch gekennzeichnet, daß durch Ankopplung von Ultraschall an die Kapillarplatte Gasblasen gelöst werden können.
21. Vorrichtung nach 18 dadurch gekennzeichnet, daß durch Ankopplung von Ultraschall die Reaktionsgeschwindigkeiten in den Kapillaren erhöht werden.

05.07.00

22. Vorrichtung nach einem der vorher genannten Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung der Wirkstoffe an die Zielmoleküle nachgewiesen wird.
23. Vorrichtung nach einem der vorher genannten Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß eine Veränderung der Zielmoleküle durch die Wirkstoffe bewirkt und nachgewiesen werden kann.
24. Vorrichtung nach 22 oder 23 dadurch gekennzeichnet, daß die Kapillarplatte transparent oder opaque ist und einer optischen Messung frei zugänglich ist.
25. Vorrichtung nach 24 dadurch gekennzeichnet, daß lösliche oder suspendierbare Wirkstoffe fluoreszenzmarkiert sind und in die Kapillaren eingebracht werden.
- 10 26. Vorrichtung nach 25 dadurch gekennzeichnet, daß nach einer bestimmten Zeit die nichtgebundenen Wirkstoffe entfernt werden und die gebundenen Wirkstoffe anhand der Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden.
27. Vorrichtung nach 24 dadurch gekennzeichnet, daß die festphasen-gebundenen peptidischen oder peptoiden Zielmoleküle fluoreszenzmarkiert sind.
- 15 28. Vorrichtung nach 27 dadurch gekennzeichnet, daß lösliche oder suspendierbare Wirkstoffe, Säuren oder andere Flüssigkeiten in die Kapillaren gespült werden, nach einer bestimmten Zeit wieder ausgespült werden und das Vorhandensein der noch gebundenen fluoreszenzmarkierten Zielmoleküle nachgewiesen wird.
- 20 29. Vorrichtung nach 26 oder 28 dadurch gekennzeichnet, daß die Fluoreszenzmarkierung mit Licht im UV, im Sichtbaren oder nahen Infrarot angeregt und detektiert wird.
30. Vorrichtung nach 29 dadurch gekennzeichnet, daß die Fluoreszenzanregung mit einem gepulsten Diolenlaser mit einer Pulsdauer von weniger als 10 ns geschieht.
- 25 31. Vorrichtung nach 30 dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Fluoreszenz zur Unterdrückung von Streulicht in einem Zeitor nach Abklingen des Anregungspulses geschieht.

DE 20005738 U1

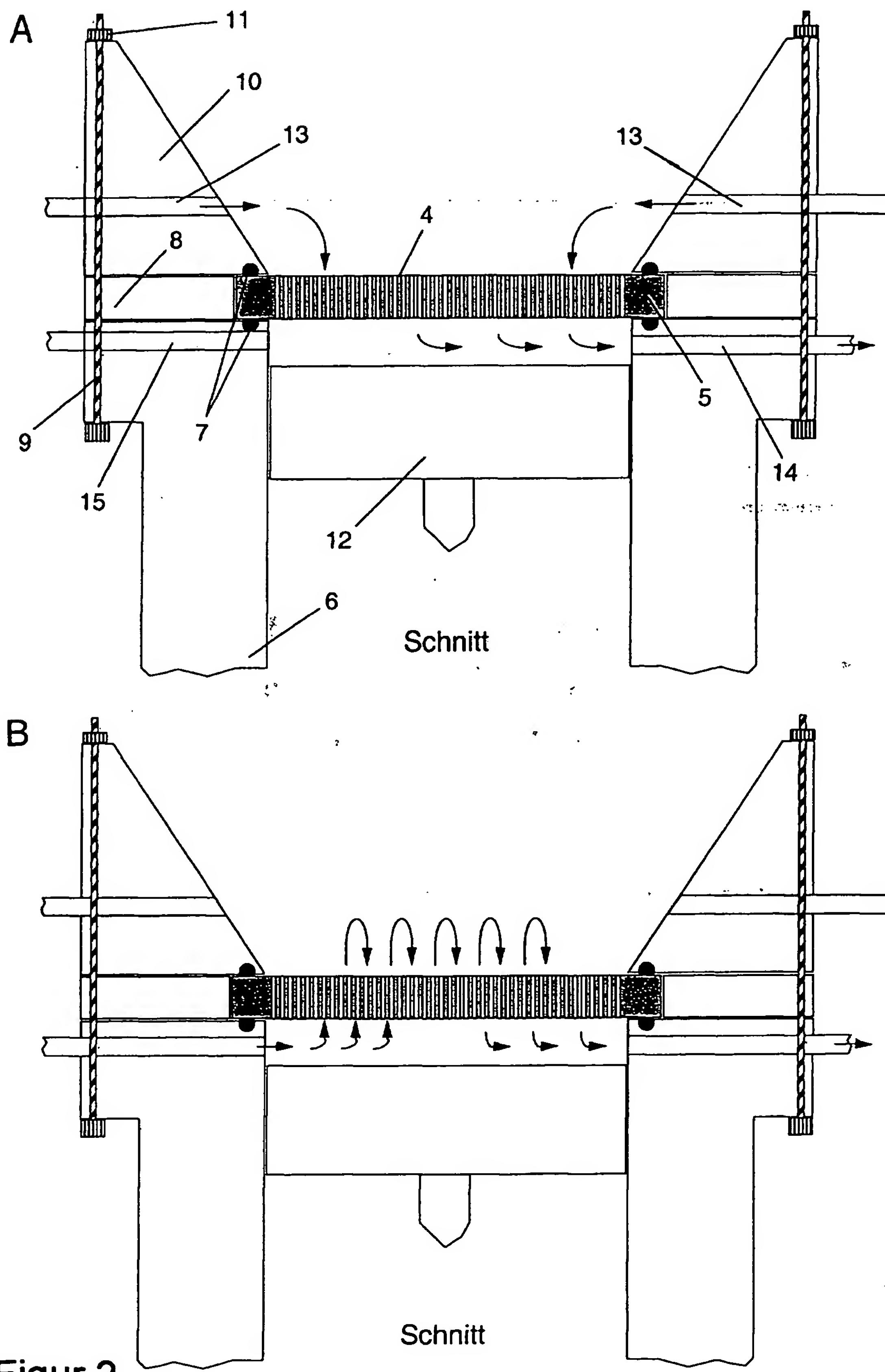
28.10.06.Ü



Figur 1

DE 200 05 738 U1

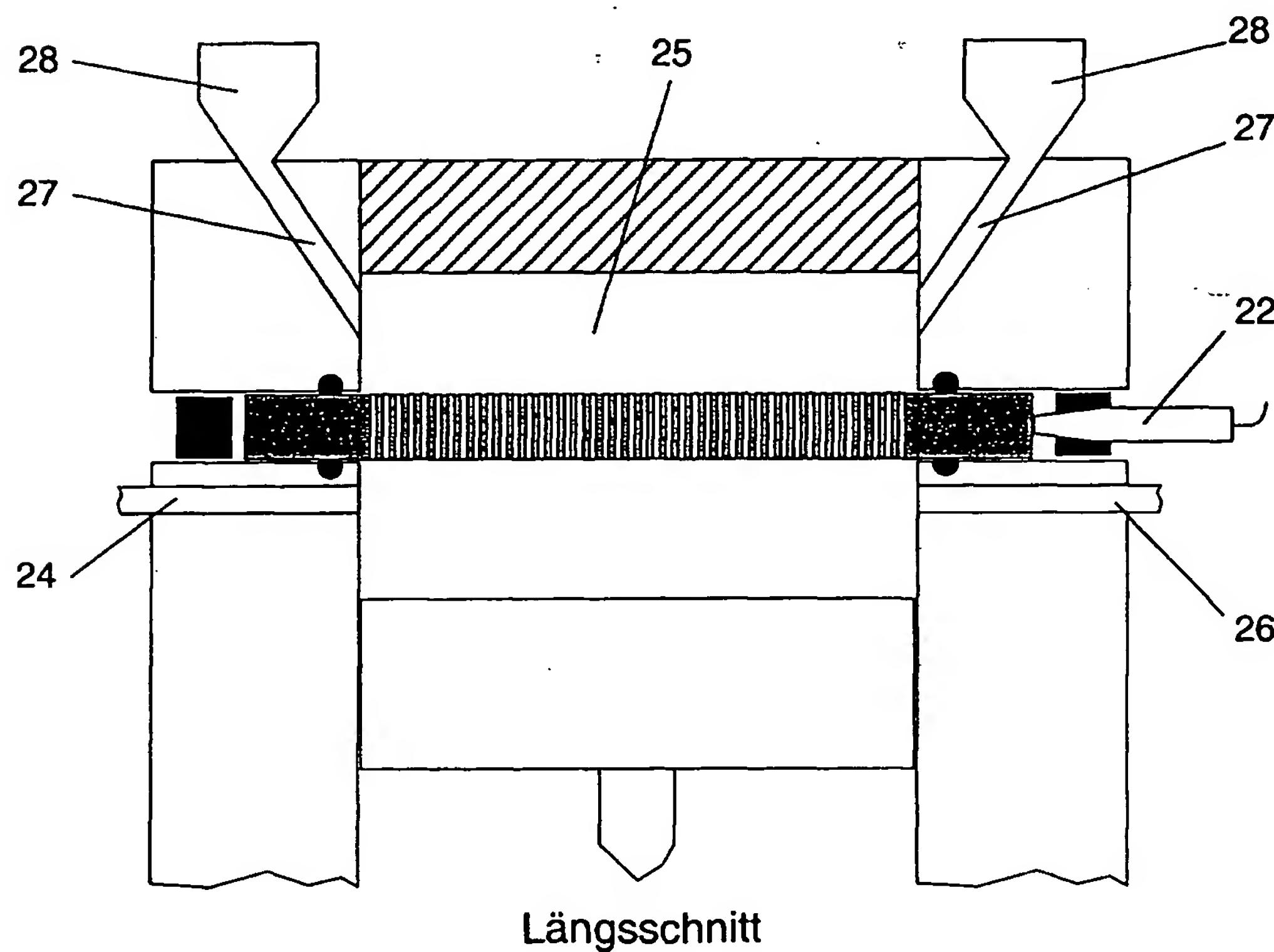
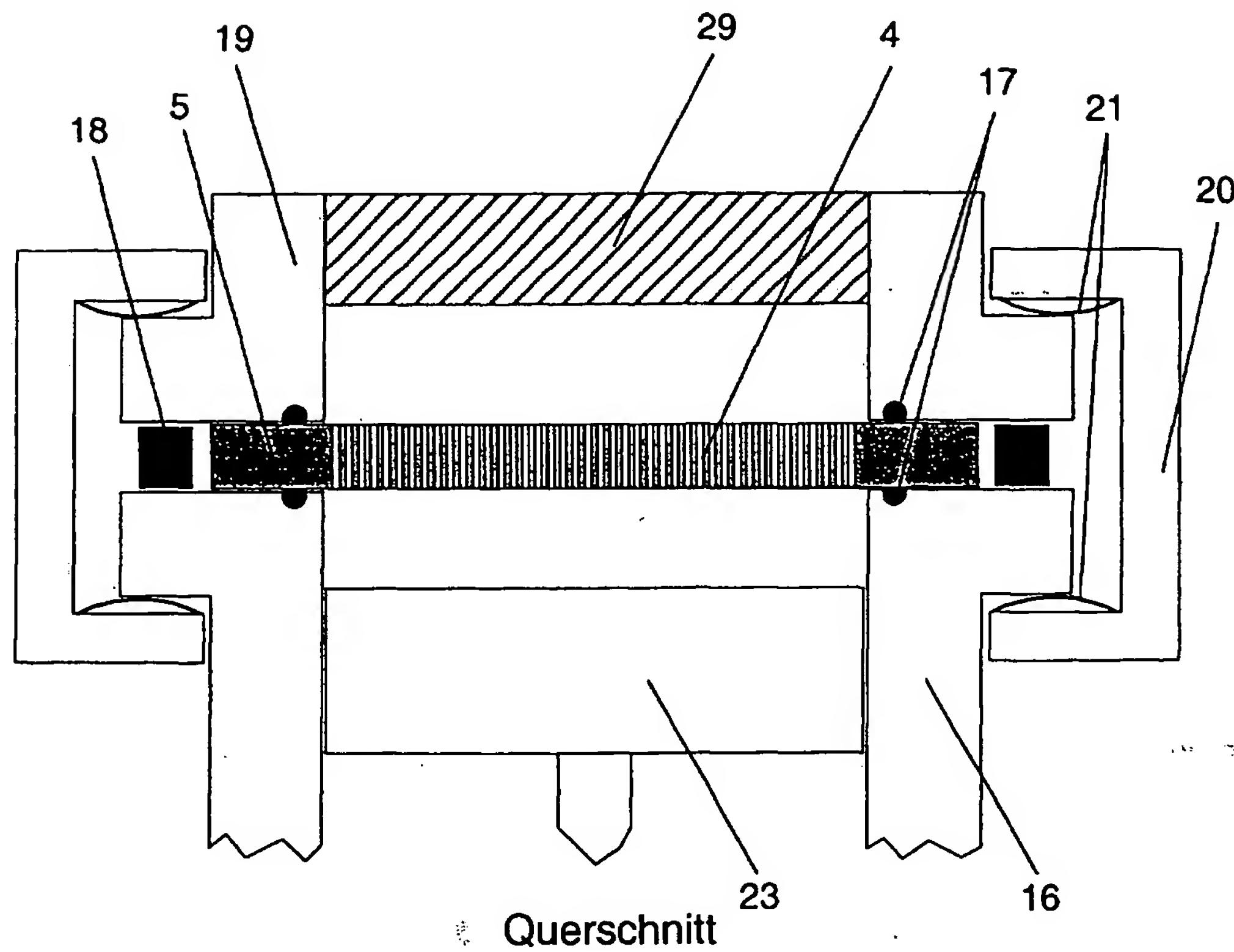
26.03.00



Figur 2

DE 200 05 736 U1

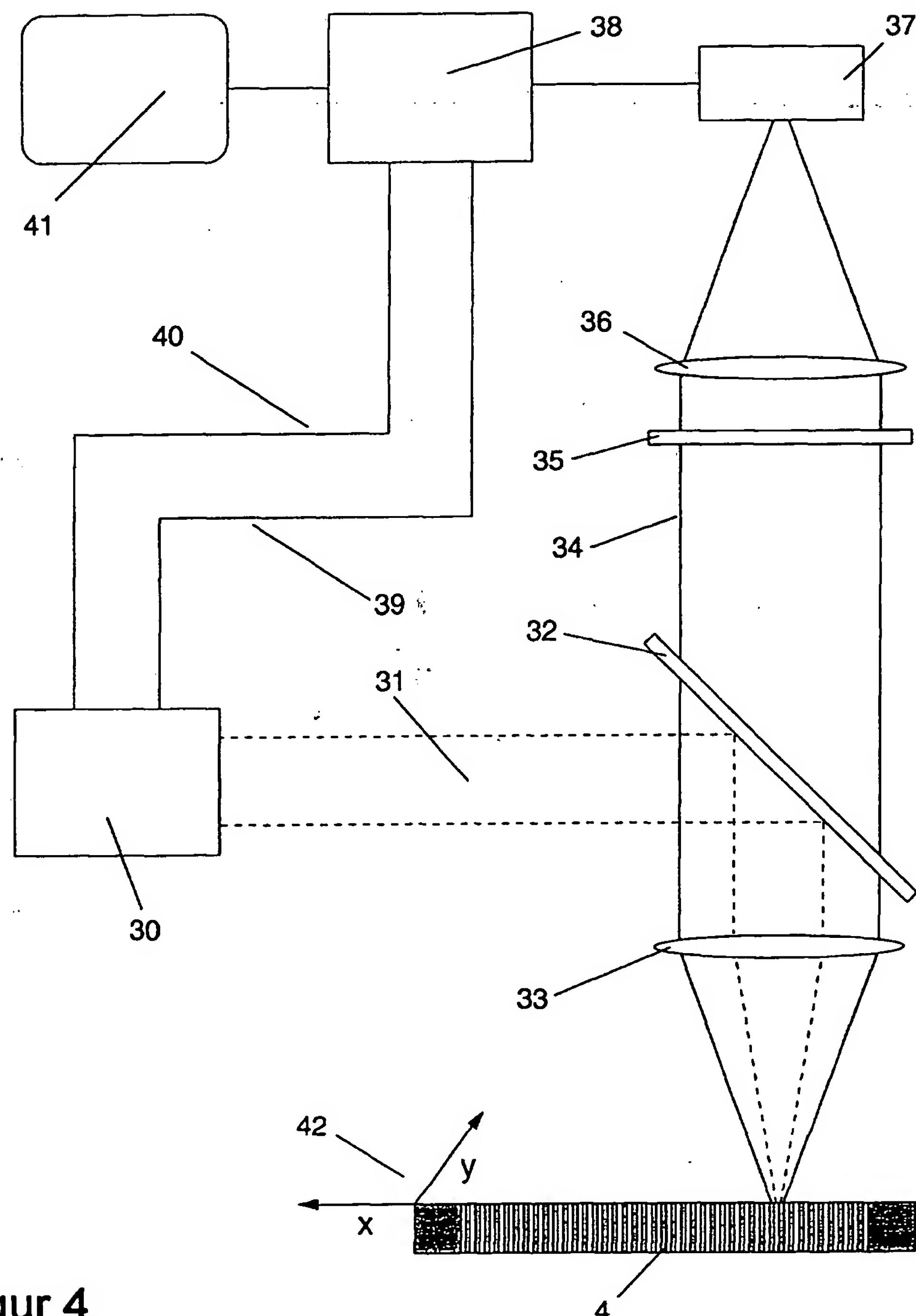
20000300



Figur 3

DE 20005738 U1

26-03-00



Figur 4

DE 200 05 738 U1